

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-202343

(43)Date of publication of application : 18.07.2003

(51)Int.Cl.

G01N 33/53
C12M 1/00
C12M 1/40
C12N 15/09
G01N 37/00

(21)Application number : 2002-309434

(71)Applicant : TORAY IND INC

(22)Date of filing : 24.10.2002

(72)Inventor : HIKASA MASAFUMI
NAGINO KUNIHISA

(30)Priority

Priority number : 2001326380 Priority date : 24.10.2001 Priority country : JP

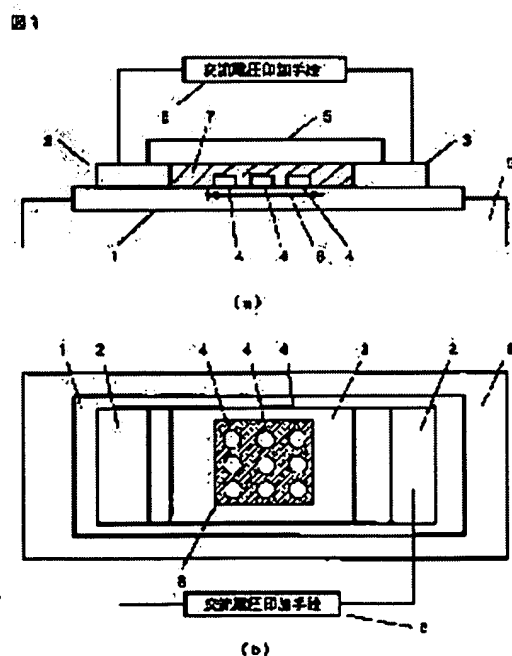
(54) METHOD FOR HYBRIDIZING SELECTIVE BONDING SUBSTANCE, HYBRIDIZATION APPARATUS, AND SUBSTRATE FOR ARRANGING SELECTIVE BONDING SUBSTANCE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an efficient hybridization apparatus of a simple structure capable of shortening reaction time of a selectively bonding substance.

SOLUTION: On a substrate, the selective bonding substance is arranged in a region for arranging the selective bonding substance. A sample solution to be tested, which contains a corresponding selective bonding substance which selectively bonds to the selective bonding substance, is brought into action to hybridize the selective bonding substance and the corresponding selective bonding substance in a process. The method for hybridizing the selective bonding substance comprises a process for impressing an A.D.

voltage between conductive electrodes arranged outside both ends of the region for arranging



THIS PAGE BLANK (USPTO)

the selective bonding substance in a direction which intersects a vertical axis of a plane for arranging the selective bonding substance in the hybridization process.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 21.09.2005

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(43) 公開日 平成15年7月18日 (2003. 7. 18)

102

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 基材上に選択結合性物質を配列した選択結合性物質配列領域で、前記選択結合性物質と選択的に結合する対応選択結合性物質を含む被検試料溶液を作用させ、前記選択結合性物質と前記対応選択結合性物質をハイブリダイゼーションさせる工程であって、選択結合性物質配列面の垂直軸に交差する方向で、且つ前記選択結合性物質配列領域の両端より外側に配置した導電電極間に交流電圧を印加する工程を有する選択結合性物質のハイブリダイゼーション方法。

【請求項 2】 基材上の選択結合性物質配列領域に複数配列した選択結合性物質固定化部位において、前記選択結合性物質と選択的に結合する対応選択結合性物質を含む被検試料溶液を作用させ、前記選択結合性物質と前記対応選択結合性物質をハイブリダイゼーションさせる工程であって、前記選択結合性物質配列領域が凹凸面からなり、前記選択結合性物質固定化部位が凹凸面の凹部の底面または凸部の端面であり、前記基板上の選択結合性物質配列領域と対向する位置に配置した封止板との間に充填された被検試料溶液を、前記選択結合性物質固定化部位に対して相対的に移動させ、前記結合反応を行わせる選択結合性物質のハイブリダイゼーション方法。

【請求項 3】 前記選択結合性物質固定化部位の垂直軸に交差する方向で、且つ前記選択結合性物質配列領域の両端より外側に配置した導電電極間に交流電圧を印加することにより、前記選択結合性物質を移動させる工程を有する、請求項 2 記載の選択結合性物質のハイブリダイゼーション方法。

【請求項 4】 前記選択結合性物質固定化部位の垂直軸に交差する方向で、且つ前記選択結合性物質配列領域の両端より外側に被検試料溶液吸入／吐出口を配置し、該被検試料溶液吸入／吐出口に結合したポンプの吸入排出により、前記被検試料溶液吸入／吐出口から前記被検試料溶液を吸入、吐出することにより、前記選択結合性物質を移動させる工程を有する、請求項 2 記載の選択結合性物質のハイブリダイゼーション方法。

【請求項 5】 前記選択結合性物質が、核酸、タンパク質、糖類、抗体又は抗原性化合物から選ばれる少なくとも 1 種である請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載のハイブリダイゼーション方法。

【請求項 6】 基材上に選択結合性物質を配列した選択結合性物質配列領域で、前記選択結合性物質と選択的に結合する対応選択結合性物質を含む被検試料溶液を作用させ、前記選択結合性物質と前記対応選択結合性物質をハイブリダイゼーションさせる装置であって、選択結合性物質配列面の垂直軸に交差する方向で、且つ前記選択結合性物質配列領域の両端より外側に配置した導電電極と、該導電電極間に交流電圧を印加する交流電圧印加手段を有する選択結合性物質のハイブリダイゼーション装置。

【請求項 7】 基材上の選択結合性物質配列領域に複数配列した選択結合性物質固定化部位において、前記選択結合性物質と選択的に結合する対応選択結合性物質を含む被検試料溶液を作用させ、前記選択結合性物質と前記対応選択結合性物質をハイブリダイゼーションさせる工程であって、前記選択結合性物質配列領域が凹凸面からなり、前記選択結合性物質固定化部位が凹凸面の凹部の底面または凸部の端面であり、前記基板上の選択結合性物質配列領域と対向する位置に配置した封止板との間に充填された被検試料溶液を、前記選択結合性物質固定化部位に対して相対的に移動させる手段を有する、前記結合反応を行わせる選択結合性物質のハイブリダイゼーション装置。

【請求項 8】 前記選択結合性物質固定化部位の垂直軸に交差する方向で、且つ前記選択結合性物質配列領域の両端より外側に配置した導電電極と、該導電電極間に交流電圧を印加する手段を有する、請求項 7 記載の選択結合性物質のハイブリダイゼーション装置。

【請求項 9】 前記選択結合性物質固定化部位の垂直軸に交差する方向で、且つ前記選択結合性物質配列領域の両端より外側に配置した被検試料溶液吸入／吐出口と、該被検試料溶液吸入／吐出口に結合した被検試料溶液吸入／吐出ポンプを有する、請求項 7 記載の選択結合性物質のハイブリダイゼーション装置。

【請求項 1 0】 基材上に選択結合性物質を配列した選択結合性物質配列領域で、前記選択結合性物質と選択的に結合する対応選択結合性物質を含む被検試料溶液を作用させ、前記選択結合性物質と前記対応選択結合性物質をハイブリダイゼーションさせる前記基材であって、基板上の選択結合性物質配列領域に配設した選択結合性物質固定部位と、選択結合性物質配列領域の両端より外側に導電電極を配設する導電電極配設部位とを有する選択結合性物質配列基材。

【請求項 1 1】 基材上の選択結合性物質配列領域に複数配列した選択結合性物質固定化部位において、前記選択結合性物質と選択的に結合する対応選択結合性物質を含む被検試料溶液を作用させ、前記選択結合性物質と前記対応選択結合性物質をハイブリダイゼーションさせる前記基材であって、前記選択結合性物質配列領域が凹凸面からなり、前記選択結合性物質固定化部位が凹凸面の凹部の底面または凸部の端面である選択結合性物質配列基材。

【請求項 1 2】 前記選択結合性物質固定化部位の垂直軸に交差する方向で、且つ前記選択結合性物質配列領域の両端より外側に配置した導電電極間に交流電圧を印加する導電電極を配設する導電電極配設部位とを有する請求項 1 1 記載の選択結合性物質配列基材。

【請求項 1 3】 前記導電電極の材質が、白金、金、銀、アルミニウム、銅、パラジウム、の金属単体あるいはそれらの合金、炭素あるいは炭素化合物、または導電性ポ

10

20

30

40

50

リマーから選ばれる少なくとも1種である請求項6、8、10、12のいずれか1項に記載のハイブリダイゼーション装置または選択結合性物質配列基材。

【請求項14】基材上の前記選択結合性物質固定化部位が該凹凸面の凹部の底面または凸部の端面である選択結合性物質配列基材であって、基材上の凹凸がサンドブラスト法、または射出成形法、またはホットエンボス法、または切削加工によって形成された請求項11記載の選択結合性物質配列基材。

【請求項15】前記選択結合性物質固定部位が基材を貫通する孔である請求項10記載の選択結合性物質配列基材。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、被検物質と選択的に結合する物質（本明細書において「選択結合性物質」）をハイブリダイゼーションさせる方法および装置に関する。

【0002】

【従来の技術】各種生物の遺伝情報解析の研究が始められており、ヒト遺伝子をはじめとして、多数の遺伝子とその塩基配列、また遺伝子配列にコードされる蛋白質およびこれら蛋白質から二次的に作られる糖鎖に関する情報が急速に明らかにされつつある。配列の明らかにされた遺伝子、蛋白質、糖鎖などの高分子体の機能については、各種の方法で調べることができる。主なものとしては、核酸についてはノーザンハイブリダイゼーション、あるいはサザンハイブリダイゼーションのような、各種の核酸／核酸間の相補性を利用して各種遺伝子とその生体機能発現との関係を調べることができる。蛋白質については、ウエスタンハイブリダイゼーションに代表されるような、蛋白質／蛋白質間の反応を利用し蛋白質の機能および発現について調べることができる。

【0003】近年、多数の遺伝子発現を一度に解析する手法としてDNAマイクロアレイ法（DNAチップ法）と呼ばれる新しい分析法、ないし方法論が開発され、注目を集めている。これらの方法は、いずれも核酸／核酸間ハイブリダイゼーション反応に基づく核酸検出・定量法である点で原理的には従来の方法と同じであり、蛋白質／蛋白質間あるいは糖鎖／糖鎖間や糖鎖／蛋白質間のハイブリダイゼーションに基づく蛋白質や糖鎖検出・定量にも応用が可能ではある。これらの技術は、マイクロアレイ又はチップと呼ばれる平面基板片上に、多数のDNA断片や蛋白質、糖鎖が高密度に整列固定化されたものが用いられている点に大きな特徴がある。マイクロアレイ法の具体的使用法としては、例えば、研究対象細胞の発現遺伝子等を蛍光色素等で標識したサンプルを平面基板片上でハイブリダイゼーションさせ、互いに相補的な核酸（DNAあるいはRNA）同士を結合させ、その箇所を蛍光色素等でラベル後、高解像度解析装置で高速

に読みとる方法や、電気化学反応にもとづく電流値等の応答を検出する方法が挙げられる。こうして、サンプル中に含まれる遺伝子の種類を迅速に推定できる。

【0004】一方、核酸／核酸間ハイブリダイゼーションに使用される核酸溶液は高価であるため、できるだけ核酸の量を少なくしてハイブリダイゼーション反応を行わせることが望ましく、その為に核酸溶液の核酸濃度を低くする事が考えられるが、低濃度の核酸溶液とのハイブリダイゼーションにおいても効率を良くする方法として、前記マイクロアレイの基板上に導電体層を有する標本核酸固定部位を配設し、該標本核酸固定部位にプラス電位を印加して電場をつくり、前記核酸溶液中の検体核酸を前記標本核酸固定部位近傍に引き寄せ、標本核酸固定部位近傍の核酸濃度を局所的に高め、ハイブリダイゼーション効率を上げる試みもなされている（例えば、特許文献1参照）。

【0005】蛋白質や糖鎖を用いたマイクロアレイについても、これら核酸を用いたマイクロアレイ同様の効果が期待される。

【0006】しかしながら、前記導電体層を用いた方法では検体核酸および標本核酸固定部位に固定された標本核酸が標本核酸固定部位に電気的に吸着されてしまうため、核酸の移動が制限され、ハイブリダイゼーションは検体核酸が標本核酸固定部位に引き寄せられる期間に起こる核酸間の衝突で飽和し、ハイブリダイゼーション時間を長くしても未反応の核酸が多数残り、ハイブリダイゼーション反応に少量の検体核酸を有効に利用することに限界がある。

【0007】

【特許文献1】特開平8-154656号公報（第4頁、図1）

【0008】

【発明が解決しようとする課題】このような状況下、高価な核酸、蛋白、糖鎖、抗体、抗原などの高分子体試料を少量でかつ有効に利用できるハイブリダイゼーションの方法を確立することは、今後重要性を増すと考えられる高分子体解析に強く求められるものであり、これが本発明が解決しようとする課題である。

【0009】具体的には、従来用いられている平面基板片上に、多数のDNA断片や蛋白質、糖鎖などの選択結合性物質が高密度に整列固定化されたマイクロアレイ、あるいは前記選択結合性物質が多孔質中空繊維内部に固定化された該多孔質中空繊維を結束固定し、配列体の繊維軸と交差する方向に切断して薄片とし、前記選択結合性物質体を繊維内部に固定した二次元高密度繊維配列体としたマイクロアレイ、あるいは繊維表面に前記選択結合性物質が高密度に整列固定化され、該繊維を三次元構造体として配列したマイクロアレイなどにおいては、ハイブリダイゼーション反応を選択結合性物質の自然拡散に依存しており、少量の選択結合性物質を含む溶液を用

いて効率よくハイブリダイゼーション反応を起こさせ、高価な選択結合性物質を有効に利用することが困難であり、この非効率性を解消すべく発明された電氣的吸引による択結合性物質のハイブリダイゼーション反応の効率化方法においても効率化は十分ではなかった。

【0010】そこで、本発明は以上説明したような従来の欠点を解消し、少量の選択結合性物質を有効に利用してハイブリダイゼーション反応を行わせるハイブリダイゼーション方法、およびハイブリダイゼーション装置を提供することを目的としている。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、上述の如き課題を解決すべく、鋭意検討を重ねた結果、ハイブリダイゼーション反応期間中、対応選択結合性物質をマイクロアレイ基板、あるいは繊維上に固定した前記選択結合性物質近傍で常時移動させ、前記選択結合性物質と前記対応選択結合性物質の衝突確率を高めることによりハイブリダイゼーション反応の効率を高め得ることを見だし、本発明を完成するに至った。

【0012】すなわち、本発明は、選択結合性物質配列基材上に選択結合性物質をアレイ状に配列した選択結合性物質配列体の前記選択結合性物質と選択的に結合する対応選択結合性物質を含む被検試料溶液を作用させ、前記選択結合性物質と前記対応選択結合性物質をハイブリダイゼーションさせる工程であって、前記選択結合性物質配列領域の両端より外側に配置した導電電極間に交流電圧を印加することにより、高価な選択結合性物質を少量でかつ有効に利用する選択結合性物質のハイブリダイゼーション方法およびそれを用いたハイブリダイゼーション装置である。

【0013】また本発明の別の態様は、基材上の選択結合性物質配列領域に複数配列した選択結合性物質固定化部位において、前記選択結合性物質と選択的に結合する対応選択結合性物質を含む被検試料溶液を作用させ、前記選択結合性物質と前記対応選択結合性物質をハイブリダイゼーションさせる工程であって、前記選択結合性物質配列領域が凹凸面からなり、前記選択結合性物質固定化部位が凹凸面の凹部の底面または凸部の端面であり、前記基板上の選択結合性物質配列領域と対向する位置に配置した封止板との間に充填された被検試料溶液を、前記選択結合性物質固定化部位に対して相対的に移動させ、前記結合反応を行わせる選択結合性物質のハイブリダイゼーション方法およびそれを用いたハイブリダイゼーション装置である。

【0014】

【発明の実施の形態】本発明の選択結合性物質のハイブリダイゼーション方法は、ハイブリダイゼーション反応期間中、対応選択結合性物質を固定した選択結合性物質近傍で常時移動させ、選択結合性物質と対応選択結合性物質の衝突確率を高めることで効率よくハイブリダイゼーション反応を行うものであり、選択結合性物質固定化部位の固定面に垂直な軸に交差する方向で、且つ選択結合性物質固定化領域の両端より外側に配置した対向する導電電極間に交流電圧を印加、あるいは凹凸部を有する基材を用いて前記選択結合性物質固定化部位の垂直軸に交差する方向で、且つ前記選択結合性物質配列領域の両端より外側に被検試料溶液吸入／吐出口を配置し、該被検試料溶液吸入／吐出口に結合したポンプの吸入排出により、前記被検試料溶液吸入／吐出口から前記被検試料溶液を吸入、吐出することにより、前記選択結合性物質を移動させることが重要である。

10

20

30

40

50

【0015】また、本発明のハイブリダイゼーション装置は上記方法を遂行するために好ましい装置であり、基材を設置する基台と、選択結合性物質を固定化した面の垂直軸に交差する方向で、且つ選択結合性物質固定化領域の両端より外側に配置した対向する導電電極と、該導電電極間に交流電圧を印加する交流電圧印加手段を有するもの、あるいは凹凸部を有する基材を用いて、前記選択結合性物質固定化部位の垂直軸に交差する方向で、且つ前記選択結合性物質配列領域の両端より外側に配置した被検試料溶液吸入／吐出口と、該被検試料溶液吸入／吐出口に結合した被検試料溶液吸入／吐出ポンプを有するものである。

【0016】さらに、本発明の選択結合性物質配列基材は、前記選択結合性物質配列領域が平坦な基材、および基材上の前記選択結合性物質配列領域が凹凸面からなり、前記選択結合性物質固定化部位が凹凸面の凹部の底面または凸部の端面である、選択結合性物質配列基材である。前記選択結合性物質固定化部位が凹凸形状を有していることは、前記選択結合性物質が基材上に固定化される形状が、予め決められた基材の形状になるため、基材形成の工程で前記選択結合性物質固定化部位の形状をコントロールすることができる点で重要である。

【0017】本発明の交流電圧を利用して、前記対応選択結合性物質を移動させる方法または装置において、前記導電電極に用いることができる材質としては、白金、金、銀、クロム、チタン、ニッケル、アルミニウム、銅、パラジウム、等の金属単体、またはこれらの金属の酸化物、窒化物あるいはそれらの合金、炭素あるいは炭素化合物、または導電性ポリマー等が挙げられ、これらの中から選ばれる少なくとも1種が含まれていればよい。

【0018】金属単体またはこれらの金属の酸化物、窒化物あるいはそれらの合金の特性としては、これらの材質を用いて配設した導電電極間に交流電圧を印加することにより前記対応選択結合性物質を含む被検試料溶液を介して前記導電電極間に電流が流れる為、被検試料溶液と反応し、被検試料溶液中に金属イオンが溶出し難い材質が望ましい。

【0019】炭素化合物の代表例としては、グラファイト

ト、フラーレン、等が挙げられる。

【0020】導電性ポリマーの代表例としては、ポリアセチレン、ポリピロール、ポリチオフィン、ポリアニリン等が挙げられ、これらの導電性ポリマーと前記金属、炭素化合物などを混ぜ合わせ、導電特性を改良した複合導電性プラスチック等も挙げられる。

【0021】導電電極は後述する理由により、予め選択結合性物質配列基材上に形成されることが望ましいが、ハイブリダイゼーション装置側に導電電極を有し、ハイブリダイゼーション準備段階で選択結合性物質配列基材上に導電電極を装着する形態でも構わない。

【0022】これらの材料を用いて基材上に電極を設置する手段として、電極材料に金属を用いる場合は基材上に導電電極の形状の開口を有するマスクを配置し、スパッタ法、蒸着法により導電電極を形成する、あるいはメッキ法を用いて厚膜の導電電極を形成する。さらには金属箔または金属薄板を接着剤で基材に接着する事により導電電極を形成事が出来る。炭素化合物を用いる場合は、基材上に導電電極の形状の開口を有するマスクを配置し、スパッタ法を用いて電極を形成することができ

る。導電性ポリマーを用いる場合は、シルクスクリーン印刷等の印刷法を用いてペースト状の導電性ポリマーを塗布し、紫外線による光硬化法を用いてペーストを硬化させ、導電電極を形成する事ができる。

【0023】また、導電電極をハイブリダイゼーション装置側に有する場合は、前記金属材料、炭素化合物、導電性ポリマーを用いて作製した薄板状の電極板をハイブリダイゼーション装置の基台上部に有し、基台状に選択結合性物質配列基材を載置した後、該電極板を選択結合性物質配列基材状に装着することにより、導電電極を形成することが出来る。

【0024】次に、本発明の被検試料溶液吸入／吐出口から前記被検試料溶液を吸入、吐出することにより前記対応選択結合性物質を移動させる方法または装置においては、被検試料溶液吸入／吐出口は前記選択結合性物質配列領域の両端より外側に配置され、被検試料溶液を吸入／吐出する際に前記選択結合性物質配列領域の全面にむらなく均一に前記被検試料溶液が流動するように吸入／吐出口の向き、形状を決めている。吸入／吐出による該被検試料溶液の流動方向については、一定方向であっても往復運動であってもよい。

【0025】また、前記被検試料が吸入／吐出口および前記ポンプに出入りする際に、該吸入／吐出口、ポンプ、およびそれらを接続する管の内壁に吸着するのを防ぐために、その内壁表面は親水性ポリマー等でコーティングされていることが望ましい。親水性ポリマーとしては、ポリエチレングリコール、ポリスチレンスルホン酸、ポリアクリル酸などが挙げられる。

【0026】次に本発明の交流電界を用いて前記対応選択結合性物質を移動させる方法の一形態について図面を

用いて説明する。本発明のハイブリダイゼーション装置の一態様の側面図を図1(a)に、平面図を図1(b)に示す。なお本発明はこの例に限定されるものではない。図1、図2において選択結合性物質配列基材1と、導電電極2、3と、カバー基材5と、交流電圧印加手段6とを備える。選択結合性物質配列基材1上に設けられた選択結合性物質固定部位4上に選択結合性物質10が固定され、選択結合性物質10がアレイ状に配列された選択結合性物質配列領域8を形成する。基台9の上に設置された選択結合性物質配列基材1上には選択結合性物質配列領域8の両側に導電電極2、3が配設され、該導電電極2、3の上にカバー基材5を架設する。前記導電電極2、3を介して選択結合性物質配列基材1とカバー基材5に挟まれた空間には前記対応選択結合性物質11を含む被検試料溶液7が満たされる。

【0027】前記選択結合性物質配列領域8に選択結合性物質10が配列される形態は、該選択結合性物質配列領域8が凹凸面からなり、前記選択結合性物質固定化部位が該凹凸面の凹部の底面または凸部の端面であり、複数配列された凹部の底面の高さは略等しく、また、複数配列された凸部の端面の高さは略等しい、それぞれ2次元平面の格子点上に配列されることが望ましいが、2次元平面の格子点からずれた位置、直線状、であっても構わない。

【0028】被検試料溶液7を満たした後、交流電圧印加手段6を用いて導電電極2、3の間に電圧を印加する。これにより、導電電極2、3間に電界が発生し、被検試料溶液7中に自然拡散している対応選択結合性物質11は負電荷を有するため、導電電極2、3間に発生した電界の方向に応じて前記選択結合性物質配列領域8を横切る方向に移動を繰り返す。具体的には、導電電極2がプラス電位、導電電極3がマイナス電位の場合、前記対応選択結合性物質11は導電電極2に引き寄せられ、導電電極2がマイナス電位、導電電極3がプラス電位の場合、前記対応選択結合性物質11は導電電極3に引き寄せられる。このように対応選択結合性物質11が前記選択結合性物質配列領域8を横切って移動する過程で選択結合性物質固定部位4上に固定された選択結合性物質10と対応選択結合性物質11が接触し、互いに相補的な配列を有している場合にハイブリダイゼーションが起こる。

【0029】尚、導電電極に印加する電圧は高いほど負電荷を有する選択結合性物質7、及び対応選択結合性物質11が導電電極から受ける電氣的吸引力あるいは電氣的斥力は強くなり、対応選択結合性物質11の移動による選択結合性物質7との接触の効果が高まることは言うまでもないが、高電圧を長時間印加させると、選択結合性物質7及び対応選択結合性物質11が損傷を受けることがある為、本実施の形態では導電電極間隔1cm当たり5Vから50Vの間に設定し、安定なハイブリダイゼ

ーション結果を得る為には、導電電極間隔 1 cm 当たり 10 V から 25 V であればさらに好ましい。

【0030】以上説明したように、本発明の交流電界によってハイブリダイゼーションの効率化を図る方法では、選択結合性物質 10 と対応選択結合性物質 11 がハイブリダイゼーションの期間中、常時相対的に移動し、衝突、接触を繰り返す為、ハイブリダイゼーションの効率が高まる。

【0031】ここで、選択結合性物質固定部位としては、通常基板上に設けた平面上の位置、基板上に設けた凹凸を用いるが、選択結合性物質配列基材 1 を貫通する穴に棒状の樹脂、ガラス、金属、繊維等を挿嵌し、該樹脂、ガラス、金属、繊維の先端を選択結合性物質固定部位として用いても同様の効果が期待できる。

【0032】また、高価な被検試料溶液 7 の量を少なくする為には前記導電電極 2、3 はできるだけ薄くする事が望ましく、前記選択結合性物質固定部位が平面または凹部底面である場合、基板面に対して、前記導電電極の高さは 2 μ m から 200 μ m であればさらに望ましい。また、前記選択結合性物質固定部位が凸部端面である場合、凸部端面に対して、前記導電電極の高さは 2 μ m から 200 μ m であればさらに望ましい。このように非常に薄く厚みムラの少ない電極を形成するために、前記導電電極は予め選択結合性物質配列基材上に形成されていることが望ましいが、ハイブリダイゼーション装置側に導電電極を有し、ハイブリダイゼーション準備段階で選択結合性物質配列基材 1 上に導電電極を装着する形態でも構わない。

【0033】なお、従来の方法においては、ハイブリダイゼーション反応は選択結合性物質の自然拡散に依存しているため、前記選択結合性物質 10 と対応選択結合性物質 11 の接触確率は低く、従ってハイブリダイゼーション反応の効率は低かった。さらに、この非効率性を解消すべく図 3、図 4 に示すように電気的吸引による選択結合性物質のハイブリダイゼーション反応の効率化を狙った方法においても効率化は十分ではなかった。

【0034】従来の電気吸引によるハイブリダイゼーション効率化の方法について図 3、図 4 を用いて説明する。選択結合性物質配列基材 1 2 上に設けられた選択結合性物質固定部位 1 5 上に選択結合性物質 10 が固定される。選択結合性物質配列基材 1 2 上には選択結合性物質 10 が配列された領域の外側に支持材 1 3 が配設され、支持材 1 3 の上にカバー基材 1 4 が架設される。前記支持材 1 3 を介して選択結合性物質配列基材 1 2 とカバー基材 1 4 に挟まれた空間には対応選択結合性物質 11 を含む被検試料溶液 1 8 が満たされる。被検試料溶液 1 8 を満たした後、電圧印加手段 1 7 を用いて、電極 1 6 に負電位を、導電性を持つ層を有する選択結合性物質固定部位 1 5 に正電位を印加することにより、電極 1 6 と選択結合性物質固定部位 1 5 との間に電界が発生し、

被検試料溶液 1 8 中に自然拡散している対応選択結合性物質 11 は負電荷を有するため、前記選択結合性物質固定部位 1 5 に吸引される。これにより選択結合性物質固定部位 1 5 周辺の対応選択結合性物質 11 の濃度が高くなり、あるいは選択結合性物質固定部位 1 5 に対応選択結合性物質 11 が吸着する過程で選択結合性物質 10 と対応選択結合性物質 11 が接触し、ハイブリダイゼーションが起こる。

【0035】しかし、図 3 に示す方法では、対応選択結合性物質 11 は電気力により選択結合性物質固定部位 1 5 に吸着されてしまい、さらには対応選択結合性物質 11 と同じ負電荷を持つ選択結合性物質 10 も選択結合性物質固定部位 1 5 の表面に吸着されてしまい、選択結合性物質 10 と対応選択結合性物質 11 の間で相対的な動きが無くなる為、本発明と比べて選択結合性物質 10 と対応選択結合性物質 11 の動的な接触確率が低い。

【0036】次に、本発明の被検試料溶液吸入／吐出口から前記被検試料溶液を吸入、吐出することにより前記対応選択結合性物質を移動させる方法の 1 形態について説明する。なお本発明はこの例に限定されるものではない。図 5 において選択結合性物質配列基材 1 と、スペーサ 2 5 と、カバー基材 2 6 と、ポンプ 2 1 と、吸入口 2 0 と、排出口 1 9 とを備える。選択結合性物質配列基材 1 上に設けられた選択結合性物質固定部位 4 上に選択結合性物質が固定され、該選択結合性物質がアレイ状に配列された選択結合性物質配列領域 8 を形成する。基台 9 の上に載置された選択結合性物質配列基材 1 上には選択結合性物質配列領域 8 の両側にスペーサ 2 5 が配設され、該スペーサ 2 5 の上にカバー基材 2 6 を架設する。前記スペーサ 2 5 を介して選択結合性物質配列基材 1 とカバー基材 2 6 に挟まれた空間には前記対応選択結合性物質を含む被検試料溶液 7 が満たされる。

【0037】ここで、選択結合性物質配列領域 8 が平面からなる前記選択結合性物質配列基材の場合、前記選択結合性物質配列領域 8 に選択結合性物質 10 が配列される形態は 2 次元平面の格子点上に配列されることが望ましいが、2 次元平面の格子点からずれた位置、直線状、あるいは選択結合性物質固定部位 4 の位置が選択結合性物質配列基材 1 の表面に垂直な方向にそれぞれ段差を持つことにより、3 次元的な配列形態であっても構わない。

【0038】また、選択結合性物質配列領域 8 が凹凸面からなる前記選択結合性物質配列基材の場合、前記選択結合性物質配列領域 8 に選択結合性物質 10 が配列される形態は、該選択結合性物質固定部位が該凹凸面の凹部の底面または凸部の端面であり、複数配列された凹部の底面の高さは略等しく、また、複数配列された凸部の端面の高さは略等しい、それぞれ 2 次元平面の格子点上に配列されることが望ましいが、2 次元平面の格子点からずれた位置、直線状、であっても構わない。

【0039】前記選択結合性物質固定化部位が、凹部底面である前記選択結合性物質配列基材の場合、前記凹部の底面の高さは、基板表面に対して $5\mu\text{m}$ 以上 $500\mu\text{m}$ 以下であることが望ましい。また、前記選択結合性物質固定化部位が、凸部端面である前記選択結合性物質配列基材の場合、前記選択結合性物質固定化部位の凸部の端面の高さは、基板面と略同等であり、凸部のまわりが凹んだ形状であり、凸部の端面から、そのまわりの凹んだ部位の底面までの高さが $5\mu\text{m}$ 以上 $500\mu\text{m}$ 以下であることが望ましい。さらには、前記選択結合性物質固定化部位が、凸部端面である前記選択結合性物質配列基材のもう1つの形態として、前記選択結合性物質固定化部位の凸部の端面の高さは基板面に対して $5\mu\text{m}$ 以上 $500\mu\text{m}$ 以下の高さであっても構わない。

【0040】被検試料溶液7を満たした後、ポンプ21を用いて吸入口210から被検試料溶液7を吸入し、排出口119から被検試料溶液7を排出することにより、選択結合性物質配列基材1とカバー基材26に挟まれた空間に被検試料溶液7を循環させ、前記対応選択結合性物質11は前記選択結合性物質配列領域8を横切る方向に移動する。このように対応選択結合性物質11が前記選択結合性物質配列領域8を横切って移動する過程で選択結合性物質固定部位4上に固定された選択結合性物質10と対応選択結合性物質11が接触し、互いに相補的な配列を有している場合にハイブリダイゼーションが起こる。

【0041】以上説明したように、本発明の被検試料溶液吸入／吐出口から前記被検試料溶液を吸入、吐出することにより前記対応選択結合性物質を移動させ、ハイブリダイゼーションの効率化を図る方法では、選択結合性物質10と対応選択結合性物質11がハイブリダイゼーションの期間中、常時相対的に移動し、衝突、接触を繰り返す為、ハイブリダイゼーションの効率が高まる。

【0042】ここで、選択結合性物質固定部位としては、通常基板上に設けた平面上の位置、基板上に設けた凹凸面を用いるが、選択結合性物質配列基材1を貫通する孔に棒状の樹脂、ガラス、金属、繊維等を挿嵌し、該樹脂、ガラス、金属、繊維の先端を選択結合性物質固定部位として用いても同様の効果が期待できる。

【0043】また、高価な被検試料溶液7の量を少なくする為には前記スペーサ25はできるだけ薄くする事が望ましく、前記選択結合性物質固定部位が凹部底面である場合、基板面に対して、スペーサの高さは $2\mu\text{m}$ から $200\mu\text{m}$ であればさらに望ましい。また、前記選択結合性物質固定部位が凸部端面である場合、凸部端面に対して、スペーサの高さは $2\mu\text{m}$ から $200\mu\text{m}$ であればさらに望ましい。このように非常に薄い前記スペーサは予め選択結合性物質配列基材上に一体形成されていることが望ましいが、ハイブリダイゼーション準備段階で選択結合性物質配列基材1上にスペーサ25を装着する形

態でも構わない。

【0044】これと比較して、従来の被検試料溶液を静置させる方法では、選択結合性物質10と対応選択結合性物質11の間で相対的な動きが無い為、本発明と比べて選択結合性物質10と対応選択結合性物質11の動的な接触確率が低い。

【0045】ここで、「選択結合性物質」とは、被検物質と直接的又は間接的に、選択的に結合し得る物質を意味し、代表的な例として、核酸、タンパク質、糖類及び他の抗原性化合物を挙げることができる。核酸は、DNAでもRNAでもよい。特定の塩基配列を有する一本鎖核酸は、該塩基配列又はその一部と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸と選択的にハイブリダイズして結合するので、本発明でいう「選択結合性物質」に該当する。また、タンパク質としては、抗体及びFabフラグメントやF(ab')₂フラグメントのような、抗体の抗原結合性断片、並びに種々の抗原を挙げることができる。抗体やその抗原結合性断片は、対応する抗原と選択的に結合し、抗原は対応する抗体と選択的に結合するので、「選択結合性物質」に該当する。糖類としては、多糖類が好ましく、種々の抗原を挙げることができる。また、タンパク質や糖類以外の抗原性を有する物質を固定化することもできる。「選択結合性物質」として、特に好ましいものは、核酸、抗体及び抗原である。本発明に用いる選択結合性物質は、市販のものでもよく、また、生細胞などから得られたものでもよい。

【0046】生細胞からのDNA又はRNAの調製は、公知の方法、例えばDNAの抽出については、Blinらの方法（Blin et al., Nucl. Ac. Acids Res. 13: 2303-2305 (1976)）等により、また、RNAの抽出については、Favaloroらの方法（Favaloro et al., Methods Enzymol. 65: 718 (1980)）等により行うことができる。固定化する核酸としては、更に、鎖状若しくは環状のプラスミドDNAや染色体DNA、これらを制限酵素により若しくは化学的に切断したDNA断片、試験管内で酵素等により合成されたDNA、又は化学合成したオリゴヌクレオチド等を用いることもできる。

【0047】個々の選択結合性物質固定部位には、通常、1種類の選択結合性物質が固定されるが、例えば、変異を有する複数種類の遺伝子を同一の選択結合性物質固定部位に結合させたい場合等には、1個の選択結合性物質固定部位に複数種類の選択結合性物質を固定することも可能である。

【0048】また、複数の選択結合性物質固定部位に固定される選択結合性物質は、それぞれ異なる種類の選択結合性物質としても、同一の選択結合性物質としても構わない。また、複数の選択結合性物質固定部位のうち、一部の複数の選択結合性物質固定部位に1種類の選択結合性物質を固定化し、他の一部の複数の選択結合性物質

固定部位に他の 1 種類の選択結合性物質を固定化することができる。選択結合性物質の種類、順序は選択結合性物質配列領域の中の位置によって限定されるものでない。同一の選択結合性物質を複数の選択結合性物質固定部位に固定しておき、測定感度をより高くすることも有効である。

【0049】選択結合性物質の選択結合性物質固定部位への固定は、公知の方法により行うことができる。無修飾の選択結合性物質を選択結合性物質固定部位に固定する場合には、選択結合性物質と選択結合性物質固定部位とを作用させた後、ベーキングや紫外線照射により固定できる。後述の実施例では、この方法により DNA をポリメチルメタクリレート基材に固定している。また、アミノ基で修飾された選択結合性物質を選択結合性物質固定部位に固定する場合には、グルタルアルデヒドや 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EDC) 等の架橋剤を用いて選択結合性物質固定部位の官能基と結合させることができる。選択結合性物質を含む試料を選択結合性物質固定部位に作用させる際の温度は、5℃～95℃が好ましく、15℃～65℃が更に好ましい。

【0050】本発明では、選択結合性物質をそのまま選択結合性物質固定部位に固定してもよく、また、選択結合性物質に化学的修飾を施した誘導体や、必要に応じて変性させた核酸を固定化してもよい。核酸の化学的修飾には、アミノ化、ビオチン化、ディゴキシゲニン化等が知られており [Current Protocols In Molecular Biology, Ed.; Frederick M. Ausubel et al. (1990)、脱アイソトープ実験プロトコール (1) DIG ハイブリダイゼーション (秀潤社)]、本発明ではこれらの修飾法を採用することができる。一例として、核酸へのアミノ基導入に関して説明する。アミノ基を有する脂肪族炭化水素鎖と一本鎖核酸との結合位置は特に限定されるものではなく、核酸の 5' 末端または 3' 末端のみならず核酸の鎖中 (例えば、リン酸ジエステル結合部位または塩基部位) であってもよい。この一本鎖核酸誘導体は、特公平 3-74239 号公報、米国特許 4,667,025 号、米国特許 4,789,737 号等に記載の方法にしたがって調製することができる。この方法以外にも、例えば、市販のアミノ基導入用試薬 [例えば、アミノリンク II (商標名); PE バイオシステムズジャパン社、Amino Modifiers (商標名); クロントテック社] などを用いて、又は DNA の 5' 末端のリン酸にアミノ基を有する脂肪族炭化水素鎖を導入する周知の方法 (Nucleic Acids Res., 11 (18), 6513- (1983)) にしたがって調製することができる。

【0051】上述の方法により得られた選択結合性物質配列基材は、選択結合性物質を選択結合性物質固定領域に固定した後、適当な処理をすることができる。例えば、熱処理、アルカリ処理、界面活性剤処理などを行うことにより、固定された選択結合性物質を変性させるこ

ともできる。あるいは、細胞、菌体などの生体材料から得られた選択結合性物質を使用する場合は、不要な細胞成分などを除去してもよい。そして、処理後の選択結合性物質配列基材を選択結合性物質の検出材料として用いることができる。なお、これらの処理は別々に実施してもよく、同時に実施してもよい。また、選択結合性物質を含む試料を選択結合性物質固定領域に固定する前に適宜実施してもよい。

【0052】本発明の選択結合性物質をアレイ状に配列した選択結合性物質配列基材は、固定化された選択結合性物質をプローブとして被検物質と相互作用させることにより、検体中の特定の被検物質を検出することができる。2 種類の被検試料に対して、下記に示す標識化 (区別が付くように) を行い、その差異を比較することもできる。

【0053】選択結合性物質と選択的に結合する、被検試料中の対応選択結合性物質の検出には、結合を特異的に認識することができる公知の手段を用いることができる。例えば、検体中の対応選択結合性物質に、蛍光物質、発光物質、ラジオアイソトープなどの標識体を結合し、選択結合反応及び洗浄後、この標識体を検出することができる。これら標識体の種類や標識体の導入方法に関しては、免疫測定や核酸のハイブリタイゼーションの測定のために用いられる蛍光物質や発光物質は、この分野において周知であり、種々のものが市販されているので、これらの市販の蛍光物質や発光物質を用いることができる。

【0054】また、選択結合性物質固定部位に固定された選択結合性物質と、被検試料中の対応選択結合性物質との結合反応後、若しくは結合反応と同時に、対応選択結合性物質と選択的に結合する、標識化された遊離の測定用物質を反応させ、洗浄後、対応選択結合性物質と選択結合性物質を介して選択結合性物質固定部位に結合された該測定用物質の標識を測定することによっても可能である。例えば、選択結合性物質として特定の塩基配列を有する核酸を選択結合性物質固定部位に固定し、対応選択結合性物質が該核酸と相補的な領域を含む核酸である場合に、対応選択結合性物質である該核酸中の、上記選択結合性物質と相補的な領域以外の領域と相補的な核酸を標識して測定用物質として用いることができる。また、選択結合性物質として抗原を選択結合性物質固定部位に固定し、対応選択結合性物質が該抗原と抗原抗体反応する抗体である場合に、該抗体と抗原抗体反応する第 2 抗体を標識したものを測定用物質として用いることができる。

【0055】また、選択結合性物質固定部位に電気伝導性を有する材料を用いた場合、電気化学反応にもとづく電流値等の応答を検出する方法を用いることができる。この場合、電極となる選択結合性物質固定部位に固定した試料と検体を、試料と検体の反応を促進、抑制する材

料下で反応させ、かつ、この材料の全部または一部が、結合した試料と検体の中に含有され、反応した後の電極、すなわち選択結合性物質固定部位に流れる電流値を測定することにより、試料と検体の結合の有無、結合の程度を検出できるものである。

【0056】本発明のハイブリダイゼーション装置に適用する選択結合性物質配列基材を用いた測定方法に供せられる被検物質としては、測定すべき核酸、例えば、病原菌やウイルス等の遺伝子や、遺伝病の原因遺伝子等並びにその一部分、抗原性を有する各種生体成分、病原菌やウイルス等に対する抗体等を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。また、これらの被検物質を含む検体としては、血液、血清、血漿、尿、便、髄液、唾液、各種組織液等の体液や、各種飲食物並びにそれらの希釈物等を挙げることができるがこれらに限定されるものではない。また、被検物質となる核酸は、血液や細胞から常法により抽出した核酸を標識してもよいし、該核酸を鋳型として、PCR等の核酸増幅法によって増幅したものであってもよい。後者の場合には、測定感度を大幅に向上させることが可能である。核酸増幅産物を被検物質とする場合には、蛍光物質等で標識したヌクレオシド三リン酸の存在下で増幅を行うことにより、増幅核酸を標識することが可能である。また、被検物質が抗原又は抗体の場合には、被検物質である抗原や抗体を常法により直接標識してもよいし、被検物質である抗原又は抗体を選択結合性物質と結合させた後、選択結合性物質を固定した選択結合性物質固定部位を洗浄し、該抗原又は抗体と抗原抗体反応する標識した抗体又は抗原を反応させ、被検物質である抗原又は抗体とハイブリダイズすることで選択結合性物質固定部位に結合した標識物を測定することもできる。

【0057】固定化物質と被検物質を相互作用させる工程は、従来と全く同様に行うことができる。反応温度及び時間は、ハイブリダイズさせる核酸の鎖長や、免疫反応に関与する抗原及び／又は抗体の種類等に応じて適宜選択されるが、核酸のハイブリダイゼーションの場合、通常、50℃～70℃程度で1分間～数時間、免疫反応の場合には、通常、室温～40℃程度で1分間～数時間程度である。

【0058】上記方法により、固定化された選択結合性物質と選択的に結合する核酸や抗体、抗原等の被検物質を測定することができる。すなわち、選択結合性物質として核酸を固定化した場合には、この核酸又はその一部と相補的な配列を相補的な配列を有する核酸を測定することができる。また、選択結合性物質として抗体又は抗原を固定化した場合には、この抗体又は抗原と免疫反応する抗原又は抗体を測定することができる。なお、本明細書でいう「測定」には検出と定量の両者が包含される。

【0059】本発明を用いることにより、各種生物にお

ける、遺伝子や蛋白質、糖鎖の発現を効率的、迅速かつ簡便に調べることができる。例えば、正常ヒト肝臓および肝炎ウイルス感染肝臓から抽出した核酸を標識後、本発明の選択結合性物質配列基材上に各種既知のヒト遺伝子を固定化した選択結合性物質固定部位のおおのにハイブリダイゼーションを行う。正常肝臓核酸と肝炎肝臓核酸の配列体への結合の程度を比較することにより、肝炎肝臓での遺伝子発現の変化を調べることができる。

【0060】同様に、蛋白質である各種モノクローナル抗体を結合させた繊維配列体に、標識した正常脳抽出蛋白質およびアルツハイマー脳抽出蛋白質を結合させ、結合した蛋白質を正常と比較することによりアルツハイマー脳における蛋白質の異常発現を調べることができる。

【0061】

【実施例】本発明を以下の実施例によって更に詳細に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0062】実施例1

本実施例で用いるガラス基材上で核酸の固定およびハイブリダイゼーションが確実にできることを確認する為に、生物試料に対して交叉反応をせず、熱的にも安定でハイブリダイゼーション時に加える熱で分解しないディゴキシゲニンを標識体として用いた実験を行った。

【0063】アクチン遺伝子の核酸液（宝酒造株式会社製）（該核酸濃度10μg/ml）をアミノ基導入スライドガラス基材上に個々の固定部位のサイズが直径200μm程度となるようにスポッティングし、空気中で乾燥後、紫外線処理（ストラタジーン社製UVクロスリナーを使用）を行い、核酸が固定化された基材を得た。用いた核酸配列の一部に相補的なオリゴヌクレオチドを合成し、ディゴキシゲニン(DIG: Digoxigenin、ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)で標識した。

【0064】末端アミノ化されたオリゴヌクレオチドをそれぞれ100 mMホウ酸緩衝液(pH8.5)に終濃度2 mMになるように溶かした。等量のジゴキシゲニン-3'-O-メチルカルボニル-α-アミノカブロン酸-N-ヒドロキシアスクシンイミドエステル(26mg/mlジメチルホルムアミド溶液)を加え、室温にて一晩静置した。グリコーゲン（ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社）をキャリアーとしてエタノール沈殿を行い、沈殿を風乾後、100μmolの10 mM Tris-HCl (pH7.5)、1 mM EDTAに溶かした。こうして得られたDIG標識オリゴヌクレオチドを試料核酸のモデルとして用いた。

【0065】作製した核酸固定基材をハイブリダイゼーション装置の基台に載置し、定法により（ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社、製品マニュアルに準じて実施）ハイブリダイゼーションを行った。

【0066】ハイブリダイゼーション終了後、核酸固定基材を洗浄後、抗DIG酵素標識抗体溶液を加え抗原抗体反応を行わせた。反応後、核酸固定基材を洗浄し未結

合の抗体を除去した。DIG検出試薬を添加し、平衡化した。水分を切り、光シグナルの検出を行ったところ核酸の固定化に応じてシグナルが検出された。

【0067】これにより、交流電界を印加しない従来方法で本発明のハイブリダイゼーション装置が構造的、あるいは機能上の問題が無く、ハイブリダイゼーション装置として確実に使用出来ることを確認した。

【0068】実施例2

選択結合性物質固定基材の前処理

スライドガラス(76mm×26mm×1mm)(松浪硝子工業(株)製)を純水、エタノール、NaOHの混合溶液でクリーニングした後、純水で洗浄した。さらに、クリーニングした面を純水、ポリ-L-リシンの混合溶液(組成:10%ポリ-L-リシン)に浸し、スライドガラスの表面にアミノ基を導入した。

【0069】核酸溶液2種類(宝酒造(株)製「λ Control Template & Primer Set-A」;製品番号TX803(約1000bpのλ DNA断片)、および、宝酒造(株)製「Human TFR(1kb) Template & Primer Set」;製品番号TX806(約1000bpのヒトトランスフェリンレセプターDNA断片))を元に、それぞれの核酸をPCR法により増幅した。PCR法で用いたプライマーは、それぞれの製品に同梱されているものを用了。これを精製し、精製した核酸溶液をえた。スライドガラスのアミノ基を導入した面に精製した2種類の核酸溶液をスポッティングし、空気中で乾燥後、UVクロスリンク(120mJ)を行い、2種類の核酸が核酸固定部位に固定された核酸固定基材をえた。次に、核酸と反応していないスライドガラス表面の余分なアミノ基をブロックするため、ホウ酸、純水、pH調整用NaOH、無水コハク酸、1-メチル-2-ピロリドンを混合した溶液(無水コハク酸 3gを187ml 1-メチル-2-ピロリドンに溶解し、使用直前に17ml 1M Na-borate(pH8.0)溶液を加えたもの)に核酸が固定された面を浸し、振とうした。その後、洗浄した。

【0070】RNAの処理

RNA溶液(宝酒造(株)製「λ polyA+RNA-A」;製品番号TX802)を用意した。これは上記核酸の1つ(TX803)と相補的な塩基配列を有している。これを、逆転写酵素「Super script II」(GIBCO BRL社製;製品番号18064-071)、2.5mM dATP、2.5mM dCTP、2.5mM dGTP、1.0mM dTTP、Cy5-dUTP(アマシャム・ファルマシア製;製品番号PA55022)と混合し、42℃で1時間インキュベートして逆転写し、Cy5色素が取り込まれたcDNA溶液を得た。

【0071】同様にRNA溶液(宝酒造(株)製「H

uman TFR RNA(1kb)」;製品番号TX805)を用意し、Cy5-dUTPをCy3-dUTP(アマシャム・ファルマシア製;製品番号PA53022)と変えた以外は、上記と同じ条件で逆転写し、Cy3色素が取り込まれたcDNA溶液を得た。このCy3色素の取り込まれたcDNAは上記核酸の1つ(TX806)と相補的な塩基配列を有している。

【0072】上記の色素が取り込まれた2種類のcDNA溶液を混合、精製し、さらにバッファー(3.4×SSC、0.1% SDS)に溶解してハイブリタイゼーション溶液を得た。

【0073】ハイブリタイゼーション

2種類の核酸が表面に固定された核酸固定基材をハイブリダイゼーション装置の基台上に固定し、核酸を固定した領域の両側にハイブリダイゼーション装置の交流電圧印加手段に接続された導電電極を配設した。本実施例では厚さ0.15mmの金薄板を導電電極として用いた。導電電極の間隔は1cmとした。2種類の核酸を固定した部位に20μlの前記ハイブリダイゼーション溶液を滴下し、核酸固定部位の両側の導電電極上にカバー基材を架設し、ハイブリダイゼーション溶液が蒸発しないように密閉した。さらに前記導電電極間に10V、10Hzの交流電圧を印加し、65℃の条件に30分間静置した後、カバー基材、導電電極を取り外し、洗浄した。

【0074】交流電圧を印加しない従来法と比較する為に、交流電圧を印加したサンプルと対応させるサンプルとして、導電電極間に電圧を印加しない状態で65℃の条件で16時間放置したサンプルを用意した。これを、65℃の条件で16時間放置した後、カバー基材、導電電極を取り外し、洗浄した。

【0075】蛍光検出

Cy5からの蛍光を測定するために、光学系を以下のようにした。まず、蛍光の励起光としてはレーザー(波長635nm)を用いた。まず、バンドパスフィルター(オメガオプティカル製;製品番号X1069)を光軸と垂直に配置し、励起光以外の余計な光を取り除いた。さらに、レーザービームの光軸と45度の角度になるように、ダイクロイックミラー(オメガオプティカル製;製品番号XF2035)を配置し、この集光したビームをDNA溶液に浸した端面と反対のスライドガラス端面に照射した。さらに、DNA溶液に浸した端面から戻ってきた蛍光を、励起光を照射する側の端面側で集光し、先に述べた、ダイクロイックミラー(オメガオプティカル製;製品番号XF2035)を通し、さらにバンドパスフィルター(オメガオプティカル製;製品番号XF3076)を通して、余分な励起光をカットした。

【0076】Cy3からの蛍光は、ダイクロイックミラーとバンドパスフィルターをCy3用のものにし(それぞれオメガオプティカル製;製品番号XF1074、XF2017、XF3083)、照射するレーザーの波長

を532nmとした以外は上記と同じ方法で検出した。

【0077】このような方法で、上記のハイブリダイゼーション後の2種類核酸固定部位からの蛍光をCy5、Cy3のそれぞれについて測定した。TX803の核酸溶液をスポッティングした核酸固定部位からは、Cy5の蛍光のみが観察され、Cy3の蛍光は検出されなかった。TX806の核酸溶液をスポッティングした核酸固定部位からは、Cy3だけの蛍光が観察され、Cy5からの蛍光は検出されなかった。

【0078】また、このときの交流電圧を印加した核酸固定基材から得られた蛍光強度は交流電圧を印加しない従来の方法に比べて同等であった。このように、スライドガラスを導電性とし、電界を印加すれば、わずか30分のハイブリダイゼーションの時間でも十分であることが分かった。

【0079】実施例3

選択結合性物質配列基材の前処理
選択結合性物質配列基材として、基材上の凹凸をサンドブラスト法、射出成形法、ホットエンボス法、切削加工によって形成した4種類の基材を使用した。また、本実施例では、選択結合性物質固定化部位が凸形状で、該選択結合性物質固定化部位のまわりが凹んでおり、凸形状の端面の高さが基板面と同等であり、該凸形状の端面からそのまわりの凹んだ部位の底面までの高さが10.0μmである基材を使用した。

【0080】前記4種類の選択結合性物質配列基材を純水、エタノール、NaOHの混合溶液でクリーニングした後、純水で洗浄した。さらに、選択結合性物質固定化部位に純水、ポリ-L-リシンの混合溶液（組成：1.0%ポリ-L-リシン）を滴下し、選択結合性物質固定化部位の表面にアミノ基を導入した。

【0081】核酸溶液2種類（宝酒造（株）製「λ Control Template & Primer Set-A」；製品番号TX803（約1000bpのλ DNA断片）、および、宝酒造（株）製「Human TFR (1kb) Template & Primer Set」；製品番号TX806（約1000bpのヒトトランスフェリンレセプターDNA断片））を元に、それぞれの核酸をPCR法により増幅した。PCR法で用いたプライマーは、それぞれの製品に同梱されているものを用いた。これを精製し、精製した核酸溶液をえた。選択結合性物質配列基材のアミノ基を導入した選択結合性物質固定化部位に精製した2種類の核酸溶液をスポッティングし、空气中で乾燥後、UVクロスリンク（120mJ）を行い、2種類の核酸が核酸固定部位に固定された核酸固定基材を得た。次に、核酸と反応していない選択結合性物質配列基材表面の余分なアミノ基をブロックするため、ホウ酸、純水、pH調整用NaOH、無水コハク酸、1-メチル-2-ピロリドンを混合した溶液（無水コハク酸 3gを187ml 1-メチ

ル-2-ピロリドンに溶解し、使用直前に17ml 1M Na-borate (pH8.0) 溶液を加えたものに核酸が固定された面を浸し、振とうした。その後、洗浄した。

【0082】RNAの処理

RNA溶液（宝酒造（株）製「λ-polyA+RNA-A」；製品番号TX802）を用意した。これは上記核酸の1つ（TX803）と相補的な塩基配列を有している。これを、逆転写酵素「Super script II」（GIBCO、BRL社製；製品番号18064-071）、2.5mM dATP、2.5mM dCTP、2.5mM dGTP、1.0mM dTTP、Cy5-dUTP（アマシャム・ファルマシア製；製品番号PA55022）と混合し、42℃で1時間インキュベートして逆転写し、Cy5色素が取り込まれたcDNA溶液を得た。

【0083】同様にRNA溶液（宝酒造（株）製「Human TFR RNA (1kb)」；製品番号TX805）を用意し、Cy5-dUTPをCy3-dUTP（アマシャム・ファルマシア製；製品番号PA53022）と変えた以外は、上記と同じ条件で逆転写し、Cy3色素が取り込まれたcDNA溶液を得た。このCy3色素の取り込まれたcDNAは上記核酸の1つ（TX806）と相補的な塩基配列を有している。

【0084】上記の色素が取り込まれた2種類のcDNA溶液を混合、精製し、さらにバッファー（3.4XS-Ca, 0.1% SDS）に溶解してハイブリダイゼーション溶液を得た。

【0085】ハイブリダイゼーション

2種類の核酸が選択結合性物質固定化部位に固定された核酸固定基材をハイブリダイゼーション装置の基台上に固定し、核酸を固定した領域の両側にハイブリダイゼーション装置の交流電圧印加手段に接続された導電電極を配設した。本実施例では厚さ0.15mmの金薄板を導電電極として用いた。導電電極の間隔は1cmとした。2種類の核酸を固定した部位に20μlの前記ハイブリダイゼーション溶液を滴下し、核酸固定部位の両側の導電電極上にカバー基材を架設し、ハイブリダイゼーション溶液が蒸発しないように密閉した。さらに前記導電電極間に10V、10Hzの交流電圧を印加し、65℃の条件に30分間静置した後、カバー基材、導電電極を取り外し、洗浄した。

【0086】交流電圧を印加しない従来法と比較する為に、交流電圧を印加したサンプルと対応させるサンプルとして、導電電極間に電圧を印加しない状態で65℃の条件で16時間放置したサンプルを用意した。これを、65℃の条件で16時間放置した後、カバー基材、導電電極を取り外し、洗浄した。

【0087】次に、前記被検試料溶液吸入／吐出口から前記被検資料溶液を吸入、吐出することにより、前記選

択結合性物質を移動させる方法を用いて実施した。2種類の核酸が選択結合性物質固定化部位に固定された核酸固定基材をハイブリダイゼーション装置の基台上に固定し、核酸を固定した領域の両側に配置されたスペーサ上にカバー基材を架設し、ハイブリダイゼーション溶液が蒸発しないように密閉した。本実施例ではスペーサ厚さは0.15mmとし、スペーサ間隔は1cmとした。さらに前記ポンプを起動させ、流速0.5cm/secで、被検試料溶液を一定方向に流動させた状態で、65℃の条件に30分間静置した後、カバー基材、導電電極を取り外し、洗浄した。

【0088】被検試料溶液を流動させない従来法と比較する為に、前述の交流電圧を印加したサンプルと対応させるサンプルとして、導電電極間に電圧を印加しない状態で65℃の条件で16時間放置したサンプルを適用した。これを、65℃の条件で16時間放置した後、カバー基材、導電電極を取り外し、洗浄した。

【0089】蛍光検出

Cy5からの蛍光を測定するために、光学系を以下のようにした。まず、蛍光の励起光としてはレーザー（波長635nm）を用いた。まず、バンドパスフィルター（オメガオプティカル製；製品番号X1069）を光軸と垂直に配置し、励起光以外の余計な光を取り除いた。さらに、レーザービームの光軸と45度の角度になるように、ダイクロイックミラー（オメガオプティカル製；製品番号XF2035）を配置し、この集光したビームをDNA溶液に浸した端面と反対の選択結合性物質配列基材端面に照射した。さらに、DNA溶液に浸した端面から戻ってきた蛍光を、励起光を照射する側の端面側で集光し、先に述べた、ダイクロイックミラー（オメガオプティカル製；製品番号XF2035）を通し、さらにバンドパスフィルター（オメガオプティカル製；製品番号XF3076）を通して、余分な励起光をカットした。

【0090】Cy3からの蛍光は、ダイクロイックミラーとバンドパスフィルターをCy3用のものにし（それぞれオメガオプティカル製；製品番号XF1074、XF2017、XF3083）、照射するレーザーの波長を532nmとした以外は上記と同じ方法で検出した。

【0091】このような方法で、上記のハイブリダイゼーション後の2種類核酸固定部位からの蛍光をCy5、Cy3のそれぞれについて測定した。TX803の核酸溶液をスポッティングした核酸固定部位からは、Cy5の蛍光のみが観察され、Cy3の蛍光は検出されなかった。TX806の核酸溶液をスポッティングした核酸固定部位からは、Cy3だけの蛍光が観察され、Cy5からの蛍光は検出されなかった。

【0092】また、この結果は、前述した基材上の凹凸をサンドブラスト法、射出成形法、ホットエンボス法、切削加工によって形成した4種類の基材について、同等

の結果を得た。

【0093】このときの交流電圧を印加した核酸固定基材から得られた蛍光強度は交流電圧を印加しない従来の方法に比べて同等であった。このように、選択結合性物質配列基材を導電性とし、電界を印加すれば、わずか30分のハイブリダイゼーションの時間でも十分であることが分かった。

【0094】さらに、前記被検試料溶液吸入／吐出口から前記被検試料溶液を吸入、吐出することにより、前記選択結合性物質を移動させる方法においても、核酸固定基材から得られた蛍光強度は被検試料溶液を流動させない従来の方法に比べて同等であった。このように、ポンプを用いて被検試料溶液を流動させれば、わずか30分のハイブリダイゼーションの時間でも十分であることが分かった。

【0095】実施例4

選択結合性物質固定基材の前処理

導電電極を選択結合性物質配列基材上に形成するために、10mm×5mmの開口の10mmの辺が10mmの間隔を隔てて平行に対向するように、2つの開口部を配置したステンレス製マスクを選択結合性物質配列基材上に近接させて装着し、スパッタ法により前記マスクの開口部形状に相当する金電極をスライドガラス（選択結合性物質配列基材）上に設けた。

【0096】このように金電極を配置したスライドガラス（76mm×26mm×1mm）（松浪硝子工業（株）製）を純水、エタノール、NaOHの混合溶液でクリーニングした後、純水で洗浄した。さらに、選択結合性物質固定化部位に純水、ポリ-L-リシンの混合溶液（組成：10% ポリ-L-リシン）に浸し、選択結合性物質固定化部位の表面にアミノ基を導入した。

【0097】核酸溶液2種類（宝酒造（株）製「λ Control Template & Primer Set-A」；製品番号TX803（約1000bpのλ DNA断片）、および、宝酒造（株）製「Human TFR (1kb) Template & Primer Set」；製品番号TX806（約1000bpのヒトトランスフェリンレセプターDNA断片））を元に、それぞれの核酸をPCR法により増幅した。PCR法で用いたプライマーは、それぞれの製品に同梱されているものを用いた。これを精製し、精製した核酸溶液をえた。選択結合性物質配列基材の前記金電極の間のアミノ基を導入した面に精製した2種類の核酸溶液をスポッティングし、空气中で乾燥後、UVクロスリンク（120mJ）を行い、2種類の核酸が核酸固定部位に固定された核酸固定基材をえた。次に、核酸と反応していない選択結合性物質配列基材表面の余分なアミノ基をブロックするため、ホウ酸、純水、pH調整用NaOH、無水コハク酸、1-メチル-2-ピロリドンを混合した溶液（無水コハク酸 3gを187ml 1-メチル-2-

ピロリドンに溶解し、使用直前に 17 ml 1 M Na-borate (pH 8.0) 溶液を加えたもの) に核酸が固定された面を浸し、振とうした。その後、洗浄した。

【0098】RNA の処理

RNA 溶液 (宝酒造 (株) 製 「λ poly(A+RNA-A」; 製品番号 TX802) を用意し、実施例 2 の RNA 処理と同様に行い、Cy5 色素が取り込まれた cDNA 溶液、およびハイブリタイゼーション溶液を得た。

【0099】ハイブリタイゼーション

2 種類の核酸が表面に固定された核酸固定基材をハイブリダイゼーション装置の基台上に固定し、核酸固定部位の両側に配置された金電極とハイブリダイゼーション装置の交流電圧印加手段を接続した。2 種類の核酸を固定した部位に 2 μl の前記ハイブリダイゼーション溶液を滴下し、核酸固定部位の両側の導電電極上にカバー基材を架設し、ハイブリダイゼーション溶液が蒸発しないように密閉した。さらに前記導電電極間に 1.0 V、10 Hz の交流電圧を印加し、65℃の条件に 30 分間静置した後、カバー基材を取り外し、洗浄した。

【0100】蛍光検出

Cy5 および Cy3 からの蛍光を測定するために、光学系は実施例 2 の光学系と同様にし、Cy5 および Cy3 からの蛍光を検出した。

【0101】このような方法で、上記のハイブリダイゼーション後の 2 種類核酸固定部位からの蛍光を Cy5、Cy3 のそれぞれについて測定した。TX803 の核酸溶液をスポッティングした核酸固定部位からは、Cy5 の蛍光のみが観察され、Cy3 の蛍光は検出されなかった。TX806 の核酸溶液をスポッティングした核酸固定部位からは、Cy3 だけの蛍光が観察され、Cy5 からの蛍光は検出されなかった。

【0102】また、このときの交流電圧を印加した核酸固定基材から得られた蛍光強度は交流電圧を印加しない従来の方法に比べて同等であり、導電電極をハイブリダイゼーション装置側に有する場合と同等の結果が得られ

表 1

移動方法	ハイブリダイゼーション 時間	蛍光強度
加振法	30 分	0.7
磁性流体混合法	30 分	0.5
交流電界法	30 分	1.0
試料溶液流動法	30 分	1.0
従来方法	16 時間	1.0
	30 分	0.1

【0109】このように、加振法、磁性流体混合法と、従来の方法に対してはハイブリダイゼーション効率を

ることが分かった。

【0103】実施例 5

本発明の被検試料溶液、およびそれに含まれる対応選択結合性物質を前記選択結合性物質固定部位に対して相対的に移動させる方法について、本発明の実施の形態に記載した方法以外の方法で同様の実験を行った。被検試料溶液、およびそれに含まれる対応選択結合性物質の移動、ハイブリダイゼーション方法は、次の方法 (1. 加振法、2. 磁性流体法) で行った。

【0104】1. 加振法 2 種類の核酸を固定した部位に 20 μl の前記ハイブリダイゼーション溶液を滴下し、カバー基材を架設し、ハイブリダイゼーション溶液が蒸発しないように密閉した。この状態で、振幅 1 cm、1 Hz の加振台に乗せ、65℃の条件でインキュベートした後、カバー基材、導電電極を取り外し、洗浄した。

【0105】2. 磁性流体混合法 2 種類の核酸を固定した部位に、前記ハイブリダイゼーション溶液と少量の磁性流体を混合した溶液を 20 μl の滴下し、カバー基材を架設し、ハイブリダイゼーション溶液が蒸発しないように密閉した。さらに、前記選択結合性物質固定領域の両側下部に設置した電磁石により 1 Hz の交流磁界を作り、磁性流体を移動させることにより、ハイブリダイゼーション溶液を攪拌した。この状態で 65℃の条件でインキュベートした後、カバー基材、スぺーサを取り外し、洗浄した。

【0106】ここでは、選択結合性物質固定基材の前処理、RNA の処理、および蛍光検出は、実施例 3 の方法と同様に行った。

【0107】本実施例の蛍光検出結果、および実施例 3 の結果を表 1 にまとめる。尚、蛍光検出強度は、実施例 3 に記載した従来方法 (65℃、16 時間) で、ハイブリダイゼーションを行った結果を 1 とした。

【0108】

【表 1】

向上させることができた。しかしながら、本発明の交流電界法 (請求項 3 に規定した方法)、および本発明の試

料溶液流動法（請求項 4 に規定した方法）よりもハイブリダイゼーション効率は低い結果となった。

【0110】

【発明の効果】本発明のハイブリダイゼーション方法、およびハイブリダイゼーション装置を用いることにより、ハイブリダイゼーション効率が向上し、短時間でハイブリダイゼーション工程を完了することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の交流電界を用いるハイブリダイゼーション装置の断面図および平面図

【図 2】本発明における選択結合性物質の動作を示す原理図

【図 3】従来のハイブリダイゼーション装置の断面図

【図 4】従来のハイブリダイゼーション装置における選択結合性物質の動作を示す原理図

【図 5】本発明の水流を用いるハイブリダイゼーション装置の断面図および平面図

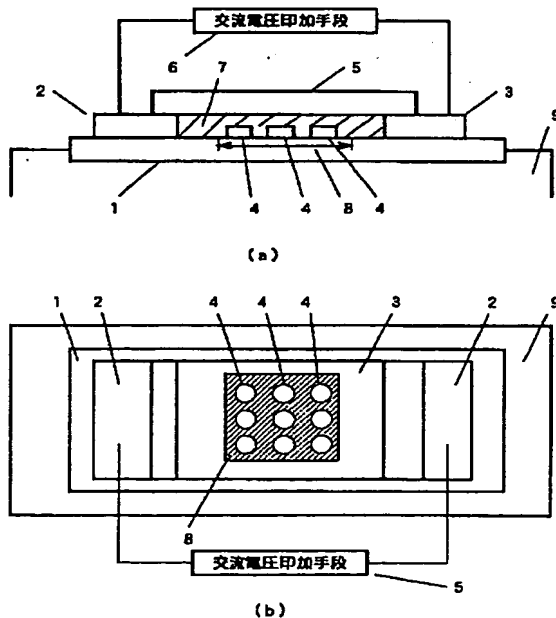
【符号の説明】

- 1 選択結合性物質配列基材
- 2 導電電極
- 3 導電電極
- 4 選択結合性物質固定部位

- 5 カバー基材
- 6 交流電圧印加手段
- 7 被検試料溶液
- 8 選択結合性物質配列領域
- 9 基台
- 10 選択結合性物質
- 11 対応選択結合性物質
- 12 選択結合性物質配列基材
- 13 支持材
- 14 カバー基材
- 15 選択結合性物質固定部位
- 16 電極
- 17 電圧印加手段
- 18 被検試料溶液
- 19 排出口
- 20 吸入口
- 21 ポンプ
- 22 被検試料溶液吸入方向
- 23 被検試料溶液排出方向
- 24 被検試料溶液流動方向
- 25 スペース
- 26 カバー基材

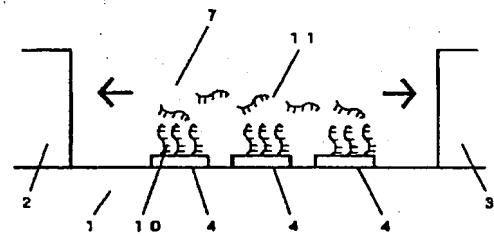
【図 1】

図 1



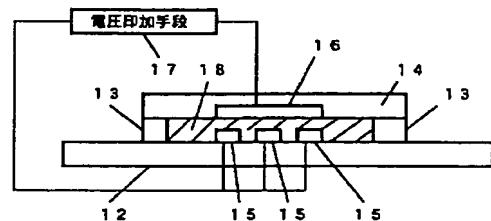
【図 2】

図 2

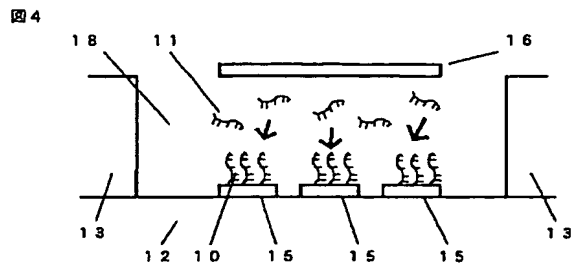


【図 3】

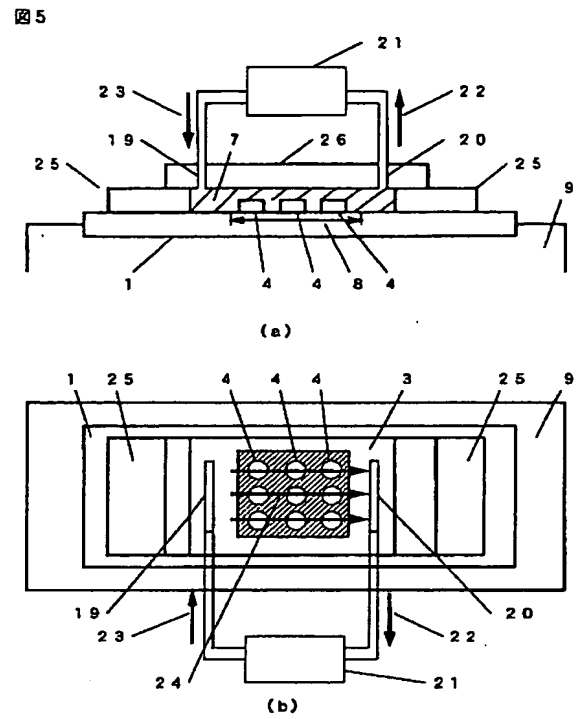
図 3



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷
G 0 1 N 37/00

識別記号
1 0 2

F I
C 1 2 N 15/00

テーマコード (参考)

A
F

THIS PAGE BLANK (USPTO)